

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47	A1	(11) 国際公開番号 WO97/00951 (43) 国際公開日 1997年1月9日(09.01.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01704 (22) 国際出願日 1996年6月19日(19.06.96) (30) 優先権データ 特願平7/178254 1995年6月20日(20.06.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本ハム株式会社(NIPPON MEAT PACKERS, INC.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 豊村浩司(TOYOMURA, Koji)(JP/JP) 村上 博(MURAKAMI, Hiroshi)(JP/JP) 重久 保(SHIGEHISA, Tamotsu)(JP/JP) 〒300-26 茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハム株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: DNA ENCODING PORCINE COMPLEMENT INHIBITOR (54) 発明の名称 ブタ補体インヒビターをコードするDNA (57) Abstract A DNA (pMCPcDNA) encoding a porcine complement inhibitor, the porcine complement inhibitor expressed therefrom and a method for screening the complement inhibitor. The pMCPcDNA can be obtained by preparing a cDNA library from porcine vascular endothelial cells and screening the cDNA encoding the porcine complement inhibitor. By using the pMCPcDNA, the porcine complement inhibitor can be produced with the use of gene recombination techniques. The pMCPcDNA is also useful in the analysis of the promoter region of the porcine complement inhibitor.		

(57) 要約

本発明は、ブタ補体インヒビターをコードするDNA (pMCPcDNA)、それから発現されるブタ補体インヒビター及び補体インヒビターのスクリーニング方法に関する。本発明のpMCPcDNAは、ブタ血管内皮細胞からcDNAライブラリーを作製し、ブタ補体インヒビターをコードするcDNAをスクリーニングすることにより得ることができる。本発明のpMCPcDNAを用いて、ブタ補体インヒビターを遺伝子組換技術で生産することができ、またブタ補体インヒビターのプロモーター領域の解析にも有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	セリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	モザンビーク	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	TA	タリナ
CN	中国	KR	大韓民国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ヴェトナム

明 細 書

ブタ補体インヒビターをコードするDNA

技術分野

- 5 本発明はブタ補体インヒビターをコードするDNAに関する。より詳細は、ブタ補体活性を抑制するインヒビター蛋白をコードするDNA、それから発現されるブタ補体インヒビター蛋白及び補体インヒビター遺伝子のスクリーニング方法に関する。

10 背景技術

- 近年、臓器移植は各国で広く行われており、特に優れた免疫抑制剤（シクロスポリン、FK506など）の開発により、ヒトからヒトへの臓器移植の拒絶反応は解決された。しかし、臓器提供者（ドナー）の不足が深刻な問題となっている。このような問題から、動物臓器のヒトへの移植、即ち異種移植が研究されている。例え
15 ば、欧米では年間約3500例の心臓移植が行われているものの、この例数は心臓移植を必要としている患者の約2～3割にしか満たないのが現状である。ドナー動物として、ヒトの近縁種（例えば、ヒヒ、チンパンジーなどの霊長類）を用いることは、ドナー動物数が少ないことや知能の高いことによる倫理的な点から問題が多い。それに対して、家畜をドナー動物とする場合には問題が少ない。特に、ブタは
20 大量に飼育されており供給が容易であること、ブタの臓器の大きさはヒトの臓器に近いこと、系統の保存などの基盤が確立されていることなどの利点を有し、ブタの臓器をヒトに移植する研究が行われている。

- ブタの臓器をヒトに移植した場合に生じる拒絶反応のうち、MHCの関与する細胞性免疫による急性の拒絶反応(Acute rejection)は、ブタとヒトでは遠縁種の関係
25 にあり、MHCの類似性がないので、起こり難いと予測されている。また、万一、このような拒絶反応が生じた場合でも、上述の優れた免疫抑制剤の使用により、回避できると考えられている。

- しかし、ヒトの血中にはブタに対する抗体が既に存在する(自然抗体と称される)。その結果、ブタの組織がヒトに移植されると、ヒト血中の自然抗体がブタの組織(抗原)を認識し、抗原・抗体複合体が形成され、この抗原・抗体複合体がヒトの補
30

体を活性化し、活性化されたヒトの補体が移植されたブタの組織を壊死させる（拒絶）。このような現象は、移植後速やかに（１時間以内）に起こるので、超急性拒絶(Hyperacute rejection)と呼ばれている。

5 補体の活性化による超急性拒絶を抑制する薬剤は開発されていない。ヒトの組織はヒトの補体による損傷を受けない。これは、ヒトの組織には補体の活性化反応を抑制する因子が発現しているからであり、この因子は補体インヒビター（又は補体制御因子）と称されている。補体インヒビターとしては、DAF (Decay accelerating factor, CD55)、MCP (Membrane cofactor protein, CD46)、CD59の3つが重要である。なお、DAF及びMCPはC3b及びC3/C5転換酵素の崩壊亢進により、CD59はC9ステップの阻害により補体の活性化を阻止すると考えられて
10 いる。

補体インヒビターは種による特異性があり、ブタ補体インヒビターはブタの補体活性を阻止することはできても、ヒトの補体活性を阻止することはできない。そのため、ブタの組織がヒトに移植されてヒトの補体系が活性化されたとき、ブタの補体インヒビターではそれを抑制することはできない。その結果、ヒトに移植された
15 ブタ組織は壊死することになる。

上記のような、ブタの臓器をヒトに移植する際の問題点を解決するには、遺伝子工学的な方法により、ブタの臓器にヒトの補体インヒビターを予め発現させておけばよい。ブタの心臓を移植する場合には、ブタの血管内皮細胞にヒトの補体インヒビターを予め発現させておけばよい。このような観点から、ヒトの補体インヒビター
20 遺伝子を組み込んだ遺伝子組換えブタ（トランスジェニックブタ）の研究が盛んに行われている。

上述のように、ヒト補体インヒビターを組み込んだトランスジェニックブタを用いて、異種移植を行うことが研究されている。現在のところ、このトランスジェニックブタ作製に使用されているプロモーターはヒト補体インヒビター由来のもの又はウイルス由来のものが用いられている。しかし、補体インヒビターのブタでの発現には、ブタ由来の補体インヒビターのプロモーターがより有効であると考えられる。そこで、上記のプロモーターを獲得するためには、まず、ブタ補体インヒビターのcDNAを得る必要がある。しかしながら、いままでブタ補体インヒビターの
25 cDNAについては知られていない。
30

本発明者等は、かかる観点から、ブタ補体インヒビターのcDNAの発現クローニングを行ったところ、細胞にブタ補体に対する抵抗性を付与し、ヒトMCPに高い相同性を示すcDNAを得た。また、この過程で、新たなcDNAライブラリーのスクリーニング方法を見出した。

5 本発明はかかる知見に基づいてなされたもので、本発明はブタ補体インヒビターのcDNA、それから発現されるブタ補体インヒビター蛋白及び補体インヒビター遺伝子のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

発明の開示

10 本発明は、配列番号1で示される塩基配列又はこの塩基配列の一部からなるDNAであり、特に配列番号1で示される塩基配列の第59番目から第1147番目までの配列からなるDNA又はこの配列を有するDNAである。

また、本発明の他の発明は、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるブタ補体インヒビター；配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA又はこの塩基配列を有するDNAで、cDNAライブラリーを宿主に導入し後、宿主に対する抗体及び補体成分を加え、生存宿主を分離することからなる補体インヒビター
15 遺伝子を有するクローンのスクリーニング方法である。

図面の簡単な説明

20 図1は、プラスミドcDNAライブラリーの概要を示す図である。

図2は、本発明のブタ補体インヒビターのcDNA（pMCP cDNA）を含むJY25細胞について、補体セレクション法による生存率を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明にかかる配列番号1に示される塩基配列は、ブタ補体インヒビターをコードするcDNA（以下、pMCP cDNAという）であり、かかるcDNAは、例えば、以下の方法により調製することができる。

まず、mRNAの調製を行う。mRNAの調製は常法に準じて行うことができ、例えば、ブタ補体インヒビターを発現している細胞、組織などから通常の方法、例
30 えば、グアニジウムチオシアネート法、ホットフェノール法、リチウム塩を用いる

方法などを用いて全RNAを抽出し、得られたRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに通すことによりpoly(A)⁺RNA(mRNA)を調製することができる。なお、この工程で、抽出細胞としては補体インヒビターの高発現部位と考えられるブタ血管内皮細胞を用いるのが好ましく、ブタ血管内皮初代培養株又はブタ血管内皮樹立細胞株PAE細胞(J. Biol. Chem. 262, 4098, 1987参照)が好適に使用される。

次に、poly(A)⁺RNAからのcDNAの合成は、通常の方法(例えば、Gublerら、Gene, 25, 263, 1983)又は市販のcDNA合成キット(例えば、ファルマシア社製、アマシャム社製、ペーリンガー・マンハイム社製等)を利用して行うことができる。得られたcDNAは、必要に応じて長塩基対のものを分別した後、常法に準じファージベクターであるλgt11に挿入したり、又は適当なプラスミドベクターに挿入することによりcDNAライブラリーを調製する。

かくして調製されたcDNAライブラリーからpMCP cDNAのクローニングを行う。pMCP cDNAのクローニングは、慣用のブランクハイブリダイゼーション法、コロニーハイブリダイゼーション法、標識化特異抗体を用いる方法などにより行うことができるが、本発明者らは、抗補体活性による新たなスクリーニング法を見出しており、この方法が好適に用いられる。

すなわち、cDNAライブラリーを適当な細胞に挿入した後、当該細胞に対する抗体(抗血清)及び補体成分(目的種の血清、この場合にはブタ血清)を加え補体活性を刺激し、抗補体作用を有する細胞を選択することにより、目的とするcDNAを含む細胞のクローニングを行うことができる。より詳細には、後記の実施例に示されるように、プラスミドベクターライブラリーを常法に準じてヒトリンパ芽球細胞JY25細胞(J. Immunology 141, 4283, 1988参照)に導入し、抗生物質含有培地で培養することにより細胞の予備選択を行う。なお、プラスミドベクターは抗生物質遺伝子を含んでいるので、当該ベクターが導入された細胞は抗生物質含有培地中でも生存・増殖することができる。抗生物質含有培地による予備選択は、細胞の選択性を高めるために行われるが、場合によっては省略することもできる。

次いで、予備選択された細胞に抗JY25抗体(抗血清)及び補体成分(目的種の血清、この場合にはブタ血清)を添加して補体活性を刺激する。pMCP遺伝子を含むプラスミドが導入されている細胞は、細胞中で補体インヒビターが発現されており、補体の活性化が阻害されるので、当該細胞は生存することができる。この

抗生物質含有培地による選択及び補体による選択を繰り返すことにより、目的とするcDNA (pMCP cDNA) を含む細胞のクローンを得ることができる。

この方法によれば、ブタ補体インヒビター (pMCP及びそれ以外のブタ補体インヒビター) のcDNAを容易に採取することができる。また、ブタ以外にも、この方法を各種動物のcDNAライブラリーに適用することにより、各種動物の補体インヒビターのcDNAを採取することができる。

かくして選別されたクローンからのpMCP cDNA (又はその一部を含むcDNA断片) の単離は、慣用のcDNA単離法に準じて行うことができ、更に必要に応じて当該cDNAをサブクローニングし、pMCP cDNA (又はその一部) を単離してもよい。なお、得られたDNAが、pMCP cDNAの一部を含むcDNAである場合には、当該DNAをプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、全長のpMCP cDNAを有するクローンを選別することができる。

得られたpMCP cDNAの塩基配列は、例えば、ジデオキシ法などの慣用の方法又は市販の塩基配列決定キット (例えば、アプライドバイオシステムズ社製DNAシーケンサー) を用いて決定することができる。

上述の方法により、pMCP cDNAのクローニング及び塩基配列の決定を行うことができ、後記の実施例で得られたpMCP cDNAは1365bpの塩基長 (配列番号1) を有し、ブタ補体インヒビターをコードする領域は1089bpであった。そして、そのうち、約600bpの翻訳領域ではヒトMCP cDNAと高い相同性 (約70%) を示した。配列番号1の塩基配列より推定されるブタ補体インヒビターの総アミノ酸数は363残基 (配列番号2) であった。

かくして得られたpMCP cDNAは、それを用いた慣用の遺伝子工学的方法により、十分量のブタ補体インヒビターを生産することが可能となるので、ブタ補体インヒビターの生産に有用である。例えば、pMCP cDNAを、適当なベクターに組み込んで発現ベクターを調製し、これを適当な宿主に導入して得た組換体を培養することによりブタ補体インヒビターを得ることができる。なお、ベクターに組み込むDNA断片として、配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードするDNA断片又はそれを含むDNA断片を用いてもよい。

ベクターとしては、必要に応じて、発現のために必要なプロモター、SD配列、

ターミネター、エンハンサー、各種マーカーなどを有するものを用いることができ、また宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌等の細菌、酵母等の微生物、動植物細胞などを用いることができる。なお、宿主細胞の種類により、目的ペプチドの糖鎖の種類やグリコシル化度の異なるものが産生されること；宿主細胞中で発現された前駆体ペプチドのN及び／又はC末端アミノ酸配列がシグナル・ペプチダーゼなどによりプロセッシングを受け、種々の末端アミノ酸配列を有するペプチドが得られることなどは、当業者において周知である。

また、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる本発明のブタ補体インヒビターは、ブタの補体の活性化を阻止する作用を有しており、またヒト補体の活性化に対しても阻止性を有しており、補体の活性化を阻害する薬剤として有用である。

なお、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる本発明のブタ補体インヒビターに関し、当該インヒビターと実質的に同効である限り、そのアミノ酸配列の一部が欠失又は他のアミノ酸により置換されていたり、他のアミノ酸配列が一部挿入されていたり、N末端及び／又はC末端に1又は2以上のアミノ酸が結合していたり、あるいは糖鎖が同様に欠失又は置換されていてもよい。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明のpMCPcDNAを用いることにより、ブタ補体インヒビターを遺伝子工学的に生産することが可能となり、十分量のブタ補体インヒビターを提供することができる。pMCPcDNAの塩基配列よりブタ補体インヒビターのアミノ酸配列を決定することができるので、このアミノ酸配列からブタ補体インヒビターをコードするDNAを合成することができ、これを用いてもブタ補体インヒビターを遺伝子工学的に生産することが可能である。遺伝子工学的方法によれば、天然に存在するものの配列を有する蛋白質のみならず、塩基配列を修飾することにより、一又は二以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失した蛋白質や、他の蛋白との融合蛋白質を生産することができる。更に、本発明のpMCPcDNAは、ブタ補体インヒビターのプロモーター領域の解析に有用である。

また、本発明のスクリーニング方法によれば、各種動物の補体インヒビターのcDNAを容易に採取することができる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づいてより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例 1

5 1) ブタ血管内皮細胞からの全RNA抽出とpoly (A)⁺RNAの精製

ブタ血管内皮細胞初代培養株又はPAE細胞 (1×10^6 細胞) を15 cmシャーレ10枚に加え、更に5.5 M GTC (ゲアニジンチオシアネート) 溶液を3 ml /シャーレに添加した。この際、溶液は多量のDNAのため粘性を有するが、18ゲージの注射針のついたシリンジ (30 ml) にて溶液の吸引排出を20~30回繰り返すことによりDNAを細断し、粘性を低下させた。

10 次いで、高速遠心 (800 rpm) して残渣を除去し、上清をポリアロマーチューブ (40 ml) に入れたCsTFA溶液 (17 ml) の上に重層し一晩超遠心した。上部のGTC層と中間のDNA層をそと取り除き、残りは廃棄した。チューブを逆さまにし余分な水分を取り除き、チューブの底から2 cmを切り取り氷の上に置いた。チューブの底のRNAをブルーチップの先で擦り取り、600 μ lの4 M GTC溶液に溶かし込んだ。軽く遠心し、不溶物を落した。600 μ l当たり15 μ lの1 M酢酸と450 mlのエタノールを加え、-20℃で3時間以上冷した後マイクロチューブ中 (4℃) 10分間遠心した。

20 上清を除き、RNAを1 mlの新しく調製したTE緩衝液 (10 mMトリス-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に迅速に溶解した。軽く遠心し、上清を採取した。上清330 μ l当たり13 μ lの2 M NaClを加え、-20℃で数時間以上冷却して、全RNAを調製した。

25 全RNAからのpoly (A)⁺RNA (mRNA) の分離精製は、クロンテック社のmRNA精製キット (原理はオリゴ (dT) -セルロースカラムを用いたアフィニティーグロマトグラフィー) を使用して行った。即ち、dT樹脂を充填したカラムを洗浄用緩衝液で数回洗浄し、その後サンプルを乗せ、再度洗浄用緩衝液で洗浄し、次いで溶出用緩衝液でdT樹脂に付いていたRNA (mRNA) を溶出し、エタノール沈殿後cDNAの調製に使用した。

30 2) cDNAライブラリー作製

上記で得られたmRNA (4 μ g) に蒸留水を加えて17 μ lにし、68℃で5

分間加熱した。氷上で10分間冷却した後、以下のものを加えた。

	x5 ファースト スtrand緩衝液	6 μ l
	0.1M DTT	3 μ l
	RNasin	1 μ l
5	リンカープライマー(1.6 μ g/ μ l)	3.3 μ l
	dNTP溶液 (10mM)	2 μ l

添加後、速やかに攪拌し、次いで43°C 2分間放置し、Super scriptIIを添加し、43°Cで1時間インキュベートした後、氷上に置いた。

次いで、上記の反応液に氷上で下記のを添加した。

10	ddH ₂ O	134.3 μ l
	x5 セカンド スtrand緩衝液	48 μ l
	dNTP溶液 (10mM)	4 μ l
	0.1M DTT	9 μ l

氷上で5分間放置し、以下のものを添加した。

15	DNAポリメラーゼ I (5U/ μ l)	12 μ l
	RNaseH (1.5U/ μ l)	2.7 μ l

添加後、速やかに攪拌し、16°C 150分間インキュベートし、T4 DNA ポリメラーゼ(3U/ μ l) 4 μ lを添加した。16°C 15分間次いで37°C 10分間インキュベートした。250 μ lのフェノール/クロロホルムで抽出し、更にフェノール/クロロホルムに100 μ l TEを加えて抽出し、抽出液をまとめ、これに以下のものを添加した。

20	3M 酢酸ナトリウム	40 μ l
	キャリアー (グリコーゲン)	10 μ l
	100% エタノール	1 ml

25 添加後、-20°Cで一晩(又は-80°Cで1時間)インキュベートした後、遠心(15,000 rpmで20分間)し、70%エタノールで洗浄し、遠心(15,000 rpmで5分間)し、15 μ l TEに溶解した。

上記で得た溶解液(4 μ l)に氷上で、以下のものを添加した。

30	10x リゲーション緩衝液	2 μ l
	SalI アダプター (1 μ g/ μ l)	1.2 μ l

ddH ₂ O	9.8 μ l
T4 DNAリガーゼ	10 ユニット(3 μ l程度)

添加後、8℃で一晩インキュベートし、70℃30分間加熱し不活化した。

次いで、この溶液(20 μ l)に以下のものを添加した。

5	NotI 緩衝液(東洋紡H)	6 μ l
	x10 トリトン	4 μ l
	x100 BSA	0.4 μ l
	ddH ₂ O	5.6 μ l
	NotI (500U/ μ l)	4 μ l

10 添加後、37℃2時間インキュベートし、70℃30分間加熱不活化した。

上記の溶液に以下のものを添加した。

1M NaCl	7 μ l
ddH ₂ O	22 μ l
グリコーゲン (10 μ g/ μ l)	1 μ l

15 添加後、小型遠心型ゲル濾過装置に付し(3,000 rpm 3分間)、ミリポアフィルター(UFCP3 TK50)で脱塩し、遠心(10,000 rpm 5分間)した後、上清を除去し、100 μ l TEを加え-80℃で遠心(10,000 rpm 15分間)した。上清を除去した後、更に100 μ l TEを加えて遠心(10,000 rpm 15分間)し、上清を除去し、100 μ l (1/10) TEを加えて遠心(10,000 rpm 20分間)した。上清を除去後、30 μ l (1/10) TEに分散し、フィルターを逆さまにし遠心(5,000 rpm 5秒 2回)することによりcDNAを得た。

次いで、氷上で以下の試料を混合した。

	cDNA	30 μ l
	発現ベクター[pMSF+(HygroB)]	21 μ l
25	x10 リゲーション緩衝液	12 μ l
	ddH ₂ O	56 μ l
	T4 DNA リガーゼ (4.6U/ μ l)	1.5 μ l

混合後、8℃一晩放置し、70℃30分間加熱して非動化した後、ミリポアフィルター(UFCP3 TK50)で脱塩した。その後、遠心(10,000 rpm 15分間)し、上清を除去し、100 μ l TEを加え遠心(10,000 rpm 15分間)した。上清を除去した後、更

に100 μ l TEを加えて遠心(10,000 rpm 15分間)し、上清を除去し、100 μ l (1/10)TEを加えて遠心(10,000 rpm 20分間)した。上清を除去後、30 μ l (1/10)TEに分散しフィルターを逆さまにし遠心(5,000 rpm 5秒)することによりcDNAライブラリー30 μ lを得た(1.2×10^6 クローン, 平均サイズ:1.5kbp)。得られたcDNAライブラリーの構造の概要を図1に示す。

3) pMCP cDNAのクローニング

対数増殖期にあるヒトリンパ芽球細胞JY25細胞(1×10^6 /10キュベット)をHeBS(800 μ l)に分散させ、これに上記のcDNAライブラリー(20 μ l /10キュベット)を加え、エレクトロポレーション(250V 960 μ F)した。

細胞を、200mlのD. MEM [20%FCS、IT (インスリン/トランスフェリン)、PS (ペニシリン/ストレプトマイシン) 含有] に分散させ、24時間培養した。次いで、400 μ g/mlのハイグロマイシンBを含有するD. MEM (10%FCF、IT、PS含有) に再分散させ、10~14日培養した(1×10^6 細胞) 後、PBSで洗浄した。

洗浄した細胞を補体セレクションに付した。即ち、細胞に、セレクション用D. MEM(10ml FCS+10ml ブタ血清+80ml D. MEM+1ml 抗JY25抗体+667 μ g 抗DAF抗体+100 μ g 抗MCP抗体含有)を添加し、37 $^{\circ}$ C 2時間インキュベートした。反応後、D. MEMで1回洗浄し、生存細胞数をトリパンブルー染色で数えた(生存細胞数: 0.1~1%)。なお、抗DAF抗体及び抗MCP抗体は選択性を高めるために加えた。生細胞をPBSで洗浄後、100ml D. MEM (10%FCS) に再分散させ、24時間培養した。

その後、上記のハイグロマイシンB含有培地での培養及び補体セレクションを2回繰り返した(生存細胞数は最終的に20%になった)。

上記で得られた生存細胞(1×10^6)を遠心(1000 rpm 5分間)した後、細胞をPBSで洗浄した。次いで、0.6%SDS/10mM EDTA混合液400 μ lを加え、十分に混合し、室温で20分間放置した。5M NaCl 100 μ lを加えて十分に混合し(細胞は白く変色した)、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した後、遠心(15000 rpm 15分間)し、上清を採取した。得られた上清に、フェノール/クロロホルム(200 μ l+200 μ l)を加え、遠心(12000 rpm 2-3分間)し、上清を採取した。上清に、10 μ l (4 μ g) のポリアクリルアミドを添加し、更に1mlのエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C

で2時間放置した。70%エタノールを加えて洗浄後、沈殿を20 μ l TEに分散した。

上記で得たcDNA(2 μ l)を50 μ lの大腸菌(MC1061)にエレクトポレーション(2.5kV 25 μ F 400 Ω)した。各キュベット(計10キュベット)のサンプルに950 μ lのSOC培地を直ちに添加した。攪拌(20 rpm)しながら37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。インキュベートしたサンプルは以下のように取り扱った。

(1)プレートにサンプル(15 μ lサンプル/プレート)を塗布し、4 $^{\circ}$ Cでプレートを保存した。

(2)残りのサンプルは2mlのTBK⁺に添加し、攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、ミニ精製(プラスミドDNAの少量調製)した。ミニ精製したcDNA(2mlサンプル)を20 μ l TEに分散させた。得られたcDNAにおいて、10 μ lは制限酵素(XhoI+NotI)で切断し、アガロースゲルを用いてcDNAのサイズをチェックした。また、残りのサンプルは、JY25細胞にエレクトポレーションし前述の補体セレクション法により選択し、生存細胞数を求めた。

上記のチェックを行った後、前記の保存プレートのうち、高生存率プレートから40コロニーを採取し、コロニーを2mlのTKB⁺で一晩培養した。培養物をミニ精製し、制限酵素(XhoI+NotI)で切断し、各cDNAの挿入サイズをチェックし、サイズによりクローンを分類した。このうち、cDNAの長さ及び頻度より適当と思われるcDNA及びバルクcDNA(対照)をJY25細胞に再度エレクトポレーションし、前述の補体セレクション法により分析した。その結果を図2に示す。図2に示されるように、バルクcDNAを導入した細胞[JY25(-pMCPcDNA)]においては生存率が極めて悪いが、選別したcDNA(pMCPcDNA)を含む細胞[JY25(+pMCPcDNA)]は高い生存率を示し、ブタ補体に対して抵抗性を示した。

高い生存率を示した細胞からcDNAを分離し、制限酵素(XhoI+NotI)で切断し、pBSIIKS⁺に結合させ、常法に準じて塩基配列の決定を行った。その結果、当該cDNAは塩基数1365bpの塩基配列(配列番号1)を有し、ブタ補体インヒビターをコードする領域は1089bpであった。そして、そのうち、約600bpの翻訳領域ではヒトMCPcDNAと高い相同性(約70%)を示した。配列番号1の塩基配列より推定されるブタ補体インヒビターの配列を配列番号2に示す。当該インヒビターの総アミノ酸数は363残基であった。

配列表

配列番号：1

配列の長さ : 1 3 6 5

配列の型：核酸

5 鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源：ブタ血管内皮細胞

配列

10	GGAAGTCGGA GAGGTCTCCG CTAGGCTGGT GTCGGGTAC CTGCTCATCT TCCCGAAA	58
	ATG ATG GCG TTT TGC GCG CTG CGC AAG GCA CTT CCC TGC CGT CCC	103
	Met Met Ala Phe Cys Ala Leu Arg Lys Ala Leu Pro Cys Arg Pro	
	5 10 15	
	GAG AAT CCC TTT TCT TCG AGG TGC TTC GTT GAG ATT CTT TGG GTG	148
15	Glu Asn Pro Phe Ser Ser Arg Cys Phe Val Glu Ile Leu Trp Val	
	20 25 30	
	TCG TTG GCC CTA GTG TTC CTG CTT CCC ATG CCC TCA GAT GCC TGT	193
	Ser Leu Ala Leu Val Phe Leu Leu Pro Met Pro Ser Asp Ala Cys	
	35 40 45	
20	GAT GAG CCA CCG AAG TTT GAA AGC ATG CGG CCC CAA TTT TTG AAT	238
	Asp Glu Pro Pro Lys Phe Glu Ser Met Arg Pro Gln Phe Leu Asn	
	50 55 60	
	ACC ACT TAC AGA CCT GGA GAC CGT GTA GAG TAT GAA TGT CGC CCC	283
	Thr Thr Tyr Arg Pro Gly Asp Arg Val Glu Tyr Glu Cys Arg Pro	
25	65 70 75	
	GGG TTC CAG CCC ATG GTT CCT GCG CTT CCC ACC TTT TCC GTC TGT	328
	Gly Phe Gln Pro Met Val Pro Ala Leu Pro Thr Phe Ser Val Cys	
	80 85 90	
	CAG GAC GAT AAT ACG TGG TCA CCC CTC CAG GAG GCT TGT CGA CGA	373
30	Gln Asp Asp Asn Thr Trp Ser Pro Leu Gln Glu Ala Cys Arg Arg	

	95	100	105	
	AAA GCC TGT TCG AAT CTA CCA GAC CCG TTA AAT GGC CAA GTT AGC			418
	Lys Ala Cys Ser Asn Leu Pro Asp Pro Leu Asn Gly Gln Val Ser			
	110	115	120	
5	TAC CCA AAT GGG GAT ATG CTG TTT GGT TCA AAG GCT CAG TTT ACC			463
	Tyr Pro Asn Gly Asp Met Leu Phe Gly Ser Lys Ala Gln Phe Thr			
	125	130	135	
	TGT AAC ACT GGT TTT TAC ATA ATT GGA GCC GAG ACT GTG TAT TGT			508
	Cys Asn Thr Gly Phe Tyr Ile Ile Gly Ala Glu Thr Val Tyr Cys			
10	140	145	150	
	CAG GTT TCT GGG AAT GTT ATG GCC TGG AGT GAG CCC TCC CCG CTA			553
	Gln Val Ser Gly Asn Val Met Ala Trp Ser Glu Pro Ser Pro Leu			
	155	160	165	
	TGT GAG AAG ATT TTG TGT AAA CCA CCT GGC GAA ATT CCA AAT GGA			598
15	Cys Glu Lys Ile Leu Cys Lys Pro Pro Gly Glu Ile Pro Asn Gly			
	170	175	180	
	AAA TAC ACC AAT AGC CAT AAG GAT GTA TTT GAA TAC AAT GAA GTA			643
	Lys Tyr Thr Asn Ser His Lys Asp Val Phe Glu Tyr Asn Glu Val			
	185	190	195	
20	GTA ACT TAC AGT TGT CTT TCT TCA ACT GGA CCG GAT GAA TTT TCA			688
	Val Thr Tyr Ser Cys Leu Ser Ser Thr Gly Pro Asp Glu Phe Ser			
	200	205	210	
	CTT GTT GGA GAG AGC AGC CTT TTT TGT ATT GGG AAG GAC GAG TGG			733
	Leu Val Gly Glu Ser Ser Leu Phe Cys Ile Gly Lys Asp Glu Trp			
25	215	220	225	
	AGT AGT GAC CCC CCT GAG TGT AAA GTG GTC AAA TGT CCA TAT CCA			778
	Ser Ser Asp Pro Pro Glu Cys Lys Val Val Lys Cys Pro Tyr Pro			
	230	235	240	
	GTA GTC CCA AAT GGA GAA ATT GTA TCA GGA TTT GGA TCA AAA TTT			823
30	Val Val Pro Asn Gly Glu Ile Val Ser Gly Phe Gly Ser Lys Phe			

	245	250	255	
	TAC TAC AAA GCA GAG GTT GTA TTT AAA TGC AAT GCT GGT TTT ACC			868
	Tyr Tyr Lys Ala Glu Val Val Phe Lys Cys Asn Ala Gly Phe Thr			
	260	265	270	
5	CTT CAT GGC AGA GAC ACA ATT GTC TGC GGT GCA AAC AGC ACG TGG			913
	Leu His Gly Arg Asp Thr Ile Val Cys Gly Ala Asn Ser Thr Trp			
	275	280	285	
	GAG CCT GAG ATG CCC CAA TGT ATC AAA GAT TCC AAG CCT ACT GAT			958
	Glu Pro Glu Met Pro Gln Cys Ile Lys Asp Ser Lys Pro Thr Asp			
10	290	295	300	
	CCA CCT GCA ACC CCA GGA CCA AGC CAT CCA GGA CCT CCC AGT CCC			1003
	Pro Pro Ala Thr Pro Gly Pro Ser His Pro Gly Pro Pro Ser Pro			
	305	310	315	
	AGT GAT GCA TCA CCA CCT AAA GAT GCT GAG AGT TTA GAT GGA GGA			1048
15	Ser Asp Ala Ser Pro Pro Lys Asp Ala Glu Ser Leu Asp Gly Gly			
	320	325	330	
	ATC ATC GCT GCA ATT GTT GTG GGC GTC TTA GCT GCC ATT GCA GTA			1093
	Ile Ile Ala Ala Ile Val Val Gly Val Leu Ala Ala Ile Ala Val			
	335	340	345	
20	ATT GCT GGT GGT GTA TAC TTT TTT CAT CAT AAA TAC AAC AAG AAA			1138
	Ile Ala Gly Gly Val Tyr Phe Phe His His Lys Tyr Asn Lys Lys			
	350	355	360	
	AGG TCG AAG TAA			1150
	Arg Ser Lys			
25	363			
	AACTGATGTG CTTAAAGTAA AAGTTGCTGA GAGGACGTGG AATCCAGCCC CTTCCCTCTC			1210
	CTGTGCTGCT GCCTGGGTCC CGTTTTGCAT GTCATGACTG TGTGCTTCCA AAAAATGCCT			1270
	TTTGTTCGTA TTTTTTTGCC TAAACGCATG ATTTGTCTC TACTTGAATT AAATCATCAC			1330
	TGAATCCACG CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA			1365
30				

配列番号 : 2

配列の長さ : 3 6 3

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : ペプチド

5 配列

Met Met Ala Phe Cys Ala Leu Arg Lys Ala Leu Pro Cys Arg Pro
5 10 15

Glu Asn Pro Phe Ser Ser Arg Cys Phe Val Glu Ile Leu Trp Val
20 25 30

10 Ser Leu Ala Leu Val Phe Leu Leu Pro Met Pro Ser Asp Ala Cys
35 40 45

Asp Glu Pro Pro Lys Phe Glu Ser Met Arg Pro Gln Phe Leu Asn
50 55 60

15 Thr Thr Tyr Arg Pro Gly Asp Arg Val Glu Tyr Glu Cys Arg Pro
65 70 75

Gly Phe Gln Pro Met Val Pro Ala Leu Pro Thr Phe Ser Val Cys
80 85 90

Gln Asp Asp Asn Thr Trp Ser Pro Leu Gln Glu Ala Cys Arg Arg
95 100 105

20 Lys Ala Cys Ser Asn Leu Pro Asp Pro Leu Asn Gly Gln Val Ser
110 115 120

Tyr Pro Asn Gly Asp Met Leu Phe Gly Ser Lys Ala Gln Phe Thr
125 130 135

Cys Asn Thr Gly Phe Tyr Ile Ile Gly Ala Glu Thr Val Tyr Cys
140 145 150

25 Gln Val Ser Gly Asn Val Met Ala Trp Ser Glu Pro Ser Pro Leu
155 160 165

Cys Glu Lys Ile Leu Cys Lys Pro Pro Gly Glu Ile Pro Asn Gly
170 175 180

30 Lys Tyr Thr Asn Ser His Lys Asp Val Phe Glu Tyr Asn Glu Val

	185	190	195
	Val Thr Tyr Ser Cys Leu Ser Ser Thr Gly Pro Asp Glu Phe Ser		
	200	205	210
	Leu Val Gly Glu Ser Ser Leu Phe Cys Ile Gly Lys Asp Glu Trp		
5	215	220	225
	Ser Ser Asp Pro Pro Glu Cys Lys Val Val Lys Cys Pro Tyr Pro		
	230	235	240
	Val Val Pro Asn Gly Glu Ile Val Ser Gly Phe Gly Ser Lys Phe		
	245	250	255
10	Tyr Tyr Lys Ala Glu Val Val Phe Lys Cys Asn Ala Gly Phe Thr		
	260	265	270
	Leu His Gly Arg Asp Thr Ile Val Cys Gly Ala Asn Ser Thr Trp		
	275	280	285
	Glu Pro Glu Met Pro Gln Cys Ile Lys Asp Ser Lys Pro Thr Asp		
15	290	295	300
	Pro Pro Ala Thr Pro Gly Pro Ser His Pro Gly Pro Pro Ser Pro		
	305	310	315
	Ser Asp Ala Ser Pro Pro Lys Asp Ala Glu Ser Leu Asp Gly Gly		
	320	325	330
20	Ile Ile Ala Ala Ile Val Val Gly Val Leu Ala Ala Ile Ala Val		
	335	340	345
	Ile Ala Gly Gly Val Tyr Phe Phe His His Lys Tyr Asn Lys Lys		
	350	355	360
	Arg Ser Lys		
25	363		
30			

請求の範囲

1. 配列番号1で示される塩基配列又はこの塩基配列の一部からなるDNA。
2. 配列番号1で示される塩基配列の第59番目から第1147番目までの配列か
5 らなるDNA又はこの配列を有するDNA。
3. 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるブタ補体インヒビター。
4. 配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA又はこの塩基配列を有
するDNA。
5. cDNAライブラリーを宿主に導入し後、宿主に対する抗体及び補体成分を加
10 え、生存宿主を分離することからなる補体インヒビター遺伝子を有するクローン
のスクリーニング方法。
6. cDNAライブラリーが、ブタcDNAライブラリーである請求の範囲5記載
のスクリーニング方法。

15

20

25

30

図 1

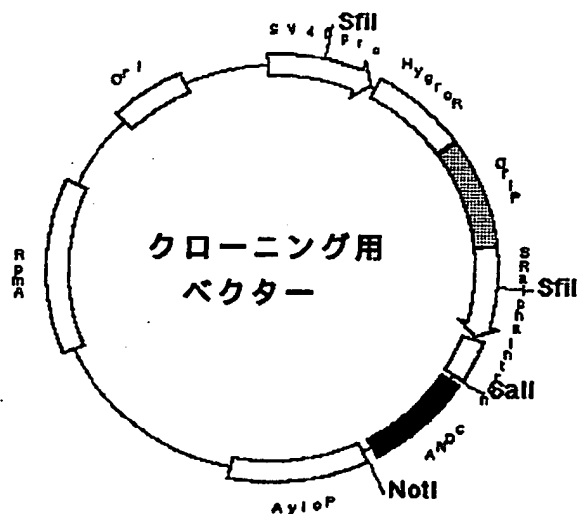
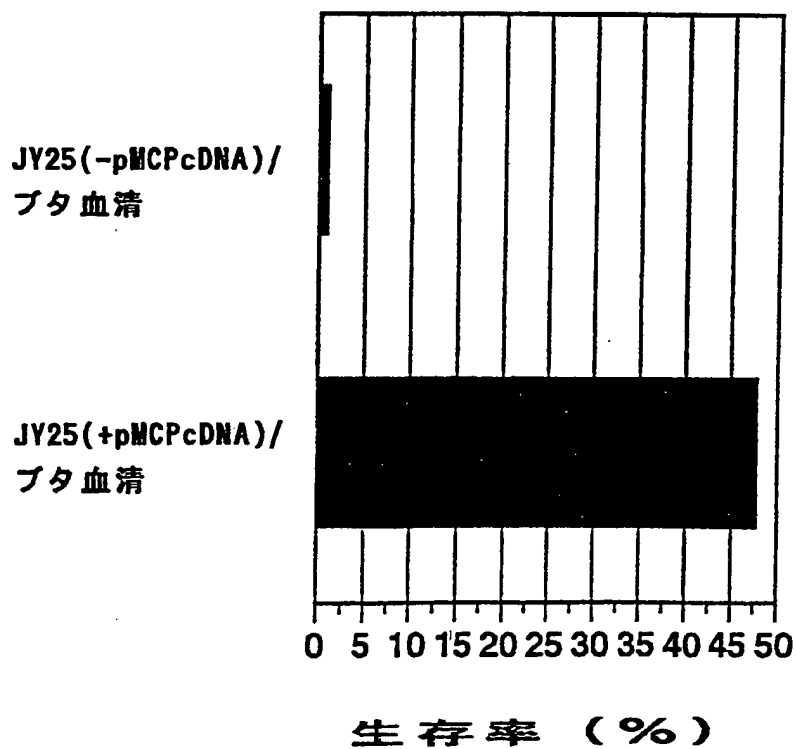


図 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C07K14/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS, WPI, Biosis Previews

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Immunology, Vol. 78, No. 3, (1993), "The sheep analogue of human CD59: purification and characterization of its complement inhibitory activity" p. 349-357	1 - 6
A	J. Immunology, Vol. 152, No. 8, (1994), "Complement-inhibiting activities of human CD59 and analogue from rat, sheep, and pig are not homologously restricted" p. 4095-4101	1 - 6
A	J. Immunological Methods, Vol. 179, No. 2, (1995), "A rapid method for the isolation of analogues of human CD59 by preparative SDS-PAGE: application to pig CD59" p. 223-231	1 - 6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
October 7, 1996 (07. 10. 96)Date of mailing of the international search report
October 15, 1996 (15. 10. 96)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01704

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁸ C12N15/12, C07K14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁸ C12N15/00, C07K14/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAS, WPI, Biosis previews

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Immunology, Vol. 78, No. 3, (1993), 「The sheep analogue of human CD59: purification and characterization of its complement inhibitory activity」 P. 349-357	1-6
A	J. Immunology, Vol. 152, No. 8, (1994), 「Complement-inhibiting activities of human CD59 and analogue from rat, sheep, and pig are not homologously restricted」 P. 4095-4101	1-6
A	J. Immunological Methods, Vol. 179, No. 2, (1995), 「A rapid method for the isolation of analogues of human CD59 by preparative SDS-PAGE: application to pig CD59」 P. 223-231	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
07.10.96

国際調査報告の発送日 **15.10.96**

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新見 浩一
電話番号 03-3581-1101 内線 3448